

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790689

研究課題名（和文） 心血管系の発生分化・循環器疾患発症を制御する転写調節機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of the transcriptional control mechanism which regulates generation, development and disease of cardiovascular system

研究代表者

西村 剛 (NISHIMURA GO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20422305

研究成果の概要（和文）：転写因子 SIP1 はヒトにおける遺伝子異常により心奇形を起こすことが報告されている。心血管系特異的 SIP1 ノックアウトマウスは大動脈弁の肥厚を来した。この大動脈弁にはプロテオグリカンとコラーゲンが蓄積していることが免疫染色で示され、培養細胞における研究で SIP1 がプロテオグリカンの代謝に携わる遺伝子を調節する可能性が示された。ヒトの先天性心疾患発現のメカニズムを解明する糸口になる成果と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Mutations in transcription factor SIP1(Smad interacting protein 1) cause cardiac malformation in human. Cardiovascular specific conditional knockout mice of SIP1 have thick aortic valve leaflets. Immunohistochemical staining showed that collagen and proteoglycan accumulate in the aortic valve leaflets of SIP1 knockout mice. The study in cultured cells revealed that SIP1 regulates the expression of genes which are relevant to the proteoglycan metabolism. This finding would throw some light on figure out the mechanism causing congenital heart disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：転写因子 SIP1, TGF β , 大動脈弁

1. 研究開始当初の背景

心血管系の形成異常は最も発生頻度の高い先天性疾患であり、また心不全・心筋症・弁膜症さらに冠動脈疾患は多くの成人が罹患し、その生活の質・生命予後を規定している。心臓の発生・形態形成と心疾患の発症に Transforming growth factor (TGF)/Bone morphogenetic protein (BMP) の関与が言われているが、その分子機構は不明な点が殆どで

ある。

我々は転写因子 δ EF1 が TGF β の刺激を受けて平滑筋形質変換に重要な役割を果たすことを以前の研究で明らかにした。また、この δ EF1 には近縁転写因子 SIP1 が存在し、SIP1 は神経堤由来の細胞に多く発現すること、ヒトにおける遺伝子欠損で心臓流出路に異常をもつ先天性心疾患を高率に発症することが報告されている。神経堤由来の細胞は心臓

の流出路及び心臓近くの大動脈形成に関与することが知られているが、SIP1については細胞脳神経系・上皮系の腫瘍発生における機能についての報告はあっても、心血管系に関する研究はまだ殆ど為されていない。

2. 研究の目的

心臓血管系の発生・形態形成・心疾患発症あるいは悪性腫瘍などの疾患に関与するサイトカインの TGF/BMP のよって制御される δ EF1 と、その近縁の転写因子 SIP1 が、心血管系の発生分化および心血管病態発症において果たす機能、作用機序、作用の標的となる転写と調節のネットワークを解析することにより、血管平滑筋細胞・大動脈弁間質細胞などの神経堤由来細胞や血管内皮細胞がどのように外部環境からの情報を受容し、いかにして環境に応じた遺伝子発現・形質の調整を行って心臓・血管の形成を行っているかを調べ、また、血管新生は心血管系の発生分化のみならず成長した個体でも悪性腫瘍・炎症などと密接に結びつく事から、この血管新生に SIP1 がどのように関与するかを調査し、(1)SIP1 による心血管系形態形成制御機構の解析 (2) SIP1/ δ EF1 転写ネットワークによる細胞分化制御機構の解明 (3)SIP1 の血管新生における役割・作用機序の解明 (4)治療への応用を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

我々はこれまでに転写因子 δ EF1/SIP1 が心臓の形態形成や血管平滑筋の分化制御に重要であることを見いだしており、さらに SIP1 が血管内皮細胞にも発現していることを確認している。

この研究成果を基礎として、 δ EF1 ノックアウトマウスと SIP1 ノックアウトマウスを用い両転写因子の心・血管病変における in vivo 機能を解析する。

SIP1 の心血管系特異的ノックアウトマウス・血管内皮細胞特異的ノックアウトマウスをもちいて、個体発生段階あるいは物理的・薬物的負荷を行った状態での組織形態・免疫組織学的観察と、空間的・時間的な遺伝子発現変化の解析を行い、心血管系の発生分化における δ EF1 並びに SIP1 の機能解析と、細胞種特異的な SIP1 の機能解析を行う。

SIP1 について、近年、上皮 - 間葉移行 (epithelial - mesenchymal transition, EMT) に関与する事が知られており、心血管系の形成において、内皮細胞が間葉系の細胞に変化することが言われていることから、特にこの点に注目して解析を行う。

この動物モデルから得た結果を基に、培養細

胞において SIP1 の作用発現機序の解析を行う。

SIP1 の作用調節については、発現誘導を行うサイトカインなどの外的因子の調査を行う。その際、SIP1 の作用調節にマイクロ RNA の関与を示す論文が一報あることから、マイクロ RNA についても調査を行う。

作用自体についてはノックアウトマウス由来の細胞を用いるほか、人為的に SIP1 の強制発現あるいは発現抑制を行った細胞で、標的遺伝子の探索を行う。これにはマイクロアレイと、クロマチン免疫沈降産物を梗塞シークエンシングする ChIP-シークエンシングの利用を考慮する。また、mammalian two-hybrid assay で、SIP1/ δ EF1 と関与する他の転写因子・コファクターの探索を行う。

4. 研究成果

血管平滑筋細胞・半月弁間質細胞特異的 SIP1 ノックアウトマウスでは出生直後の個体で大動脈弁肥厚が見られ、その所見は成長個体で一層顕著となることが観察された

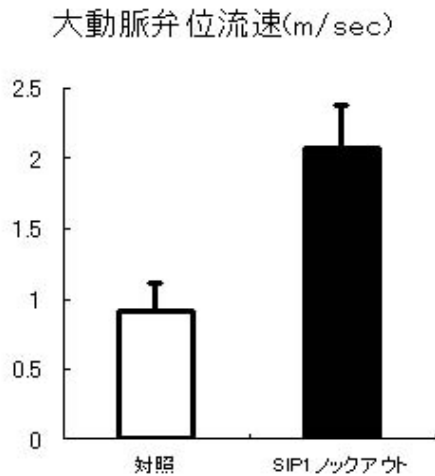
SIP1 ノックアウトマウス大動脈弁



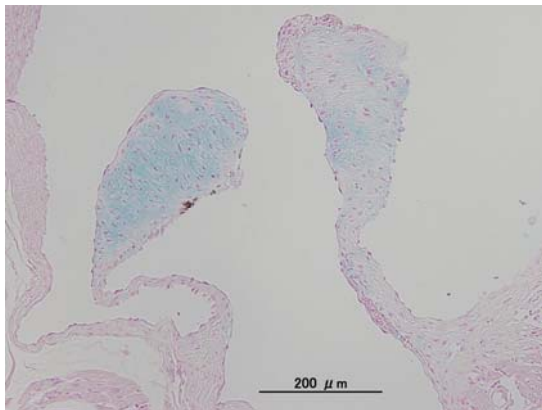
正常マウス大動脈弁



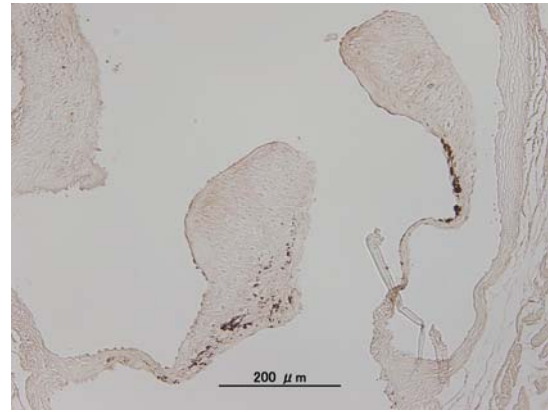
心臓超音波検査で、SIP1 ノックアウトマウスには大動脈弁狭窄を示す大動脈弁流速の上昇と、大動脈弁逆流の所見が得られ、機能的にも大動脈弁に変化が生じていることが示された。



この大動脈弁の変化の機序を示すため、大動脈弁をアルシアン青で染色すると、プロテオグリカンを示す青く染まる部分が多く見られた。



さらにコラーゲン type I の免疫染色を行ったところ、プロテオグリカンの蓄積していない部分はコラーゲン繊維が増成し手いる所見であった。(下の写真でコラーゲンは茶色に染色)



マウス胎児線維芽細胞を用い研究を進めたところ、SIP1 ノックアウトマウス由来の細胞ではプロテオグリカンの代謝に関わる酵素 ADAMTS の発現が減弱している傾向が見られた。

その具体的な調節機序・作用標的について、現在、培養細胞の刺激の仕方、ChIP-シーケンスを行う条件を検討している。

プロテオグリカンの代謝異常から先天性の弁の異常を含む心奇形を来すマウスの研究報告が散見され、ヒトにおける SIP1 の遺伝子変異により心臓の特に流出路に奇形が生じることが報告されていることから、ヒトの先天性心疾患の発生機序・治療法につながる研究になると期待し、SIP1 によるプロテオグリカンなど細胞外マトリクス調整の機序について現在研究を進めている。

血管内皮細胞特異的 SIP1 ノックアウトマウスは胎生中期に脳出血を起こし死亡する。



心臓の弁形成に内皮-間葉移行 (endo-MT) が関与することが知られていることから、このマウスにおいて、心臓の弁形成・房室間の形態を調査したが、endo-MT の欠損・異常は見られなかった。

胎児の血管内皮細胞を染色し血管走行を調べたところ、SIP1 ノックアウトマウスでは血管の分枝が亢進していると考えられる所見であった。

血管新生の制御機構の異常が生じているものと考え、血管内皮特異的 SIP1 ノックアウトを成長後の個体に誘導するマウスを準備しており、これにおいて腫瘍細胞移植実験を行い、血管新生制御のさらなる研究を進めるよう計画している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0件)

[学会発表] (計 0件)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等 無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 剛 (NISHIMURA GO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20422305

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：